

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНИЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Разрешено Минздравом Республики
Беларусь для практического
использования.

Первый заместитель Министра здра-
воохранения, председатель Совета по
внедрению

 В.И. Ореховский.

« 19 » 2001 г

Регистрационный № 91-0008

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРАТОВ И
НИТРИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ.

Инструкция по применению

Учреждение разработчик: Витебский ордена Дружбы народов
государственный медицинский университет,
Центральная научно-исследовательская
лаборатория

Авторы: Зав. ЦНИЛ д.м.н.
м.н.с. ЦНИЛ
с.н.с. ЦНИЛ к.м.н.
м.н.с. ЦНИЛ
с.л. ЦНИЛ
с.л. ЦНИЛ

Солодков А.П.
Веремей И.С.
Осочук С.С.
Щербинин И.Ю.
Деюн Г.В.
Дубровская А.В.

Витебск 2001

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

В связи с участием эндотелиального релаксирующего фактора – оксида азота (NO) во многих физиологических процессах в организме представляет значительный научно-практический интерес определение NO в биологических жидкостях. Прямые методы измерения молярной концентрации NO очень сложны и требуют дорогостоящего оборудования, в то время как количественная оценка продуктов превращения NO (нитратов и нитритов) доступна и может быть использована в клинической практике. В настоящее время происходит интенсивное накопление фактического материала по содержанию продуктов метаболизма NO ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) при различных патологических состояниях, связанных с нарушением гемодинамики. Уровень конечных продуктов метаболизма ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) в моче и плазме больных ишемическим инфарктом миокарда (ИМ) в 1-ый день заболевания можно использовать в качестве дополнительного прогностического критерия течения и прогноза ИМ: при концентрации нитратов и нитритов в моче от 20,0 мкмоль/л и в плазме от 5,0 мкмоль/л больных ИМ в первые сутки заболевания отмечается неблагоприятный прогноз ИМ, тяжелое клиническое течение ИМ; при уровне конечных продуктов деградации NO в моче от 20-90 и в плазме от 5,0 до 30,0 мкмоль/л у больных ИМ в 1-ые сутки заболевания отмечается неосложненное течение ИМ [Драпкина О.М. и др. 2000]. Показана связь между динамическими изменениями уровня нитратов и нитритов и тяжести течения геморрагического инсульта [Карпюк В.Б. 1999]. NO является главным медиатором инфекционно-токсического шока [Vasilev D. et al. 1999]. Было показано, что если у детей наблюдался высокий уровень нитратов во время церебральной малярии, то, как правило, это сопровождается более тяжелой и продолжительной комой [Al-Yaman F.M. et al 1996]. В связи с этим, в настоящее время уже ясно, что содержание продуктов деградации NO может рассматриваться как прогностический критерий тяжести процесса, исхода заболевания и эффективности лечения.

В ЦНИЛ ВГМУ разработан метод количественного определения нитратов и нитритов в плазме и моче, используя в качестве восстановителя нитратов в нитриты однократную навеску цинковой пыли, обработанную аммиачным комплексом сульфата меди.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРИНЦИПА МЕТОДА

Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата

меди, с последующим фотометрическим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Спектрофотометр СФ-46.
2. Весы аналитические.
3. Весы лабораторные электронные.
4. Магнитный смеситель с магнитом цилиндрическим.
5. Центрифуга лабораторная ОПн-8.
6. Иономер И-160.
7. Колбы стеклянные мерные.
8. Пробирки пластиковые с крышечкой.
9. Пробирки конические центрифужные.
10. Сульфаниловая кислота.
11. 1-нафтиламин солянокислый ч.д.а.
12. Натрия нитрит ч.д.а.
13. Калия нитрат ч.д.а.
14. Цинковая пыль ч.д.а.
15. Ацетат натрия х.ч.
16. Хлорид аммония х.ч.
17. Раствор аммиака 25% ч.д.а.
18. Цинка сульфат ч.д.а.
19. Натрия гидроксид ч.д.а.
20. Медн сульфат ч.д.а.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ

1. Определение уровня нитратов и нитритов в плазме крови.

1.1. *Приготовление исходных растворов реагентов.*

- 1.1.1. Сульфаниловая кислота. Растворить 0,6 г реактива в 70 мл воды, прибавить 20 мл концентрированной хлористоводородной (или уксусной) кислоты и разбавить до 100 мл.
- 1.1.2. 1-нафтиламин солянокислый. Растворить 0,6 г солянокислого нафтиламина в воде, добавив 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, разбавить до 100 мл и хранить в холодильнике; срок хранения 1 месяц.
- 1.1.3. Ацетат натрия. Навеску 16,4 г безводной соли растворить в 50 мл дистиллированной воды и фильтровать в мерную колбу на 100 мл. Довести объем до метки, промывая фильтр.

Библиотека ВГМУ



- 1.1.4. Стандартный раствор нитрита. Точную навеску нитрита натрия (0,0345 г) растворить в мерной колбе (500 мл) в дистиллированной воде (концентрация нитрита 1000 мкмоль/л).
- 1.1.5. Стандартный раствор нитрата. 0,0505 г нитрата калия количественно перенести в мерную колбу на 500 мл и довести водой до метки ($C = 1000$ мкмоль/л.)
- 1.1.6. Раствор меди сульфата. 0,8 г меди сульфата поместить в мерную колбу, добавить 2 мл 25 % раствора аммиака 3 мл аммиачного буфера pH 9,6 довести дистиллированной водой до 50 мл.
- 1.1.7. Ампулу 0,1 N фиксонала NaOH количественно перенести в мерную колбу на 100 мл и довести дистиллированной водой до метки (1 N раствор NaOH).
- 1.1.8. Аммиачный буфер (pH=9.6). 7 мл 25% раствора аммиака поместить в мерную колбу на 500 мл и довести водой до метки. 2.675 г хлорида аммония растворить в мерной колбе на 500 мл и довести водой до метки. В мерный цилиндр поместить 30,6 мл раствора хлорида аммония и довести до 100 мл раствором аммиака. Довести на иономере приготовленными растворами значение pH до 9,6.
- 1.1.9. Раствор цинка сульфата 6%. 6 г порошка цинка сульфата растворить в мерной колбе на 100 мл и довести водой до метки.
- 1.2. *Построение калибровочного графика для определения нитратов.*
 - 1.2.1. Пронумеровать 5 мерных колб на 100 мл, добавить туда 2, 4, 6, 8, 10 мл стандартного раствора нитрата калия $C = 1000$ мкмоль/л и довести водой до метки. Концентрация нитратов в каждой колбе равна 20, 40, 60, 80, 100 мкмоль/л соответственно. В 15 пластиковых пробирок пронумерованных – 1, 1', 1'', 2, 2', 2'' и.т.д (для трехкратного повторения) добавить 0,11 г цинковой пыли, 0.5 мл аммиачного буфера. 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди и по 1 мл пробы из каждой мерной колбы: из колбы №1 в пробирки 1, 1', 1'' ; из колбы № 2 в пробирки 2, 2', 2'', и.т.д. Пробирки укупорить и встряхивать в течение 20 минут. Цинковую пыль осадить центрифугированием при 3000 об/мин (1500 г) 10 минут.
 - 1.2.2. 15 стеклянных пробирок пронумеровать так же как и пластиковые. Из каждой пластиковой пробирки перенести по 1 мл супернатанта в соответствующую по маркировке стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавить по 1 мл

сульфаниловой кислоты и оставить в холодильник на 10 мин. до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измерить оптическую плотность спустя 30 мин. при длине волны 520 нм.

1.2.3. Построить калибровочный график.

1.2.4. При наличии компьютера калибровочный график построить с использованием регрессионного анализа.

1.2.5. Нижний надежный предел обнаружения нитратов данным методом составил 5,46 мкмоль/л.

1.3. *Проведение основного опыта.*

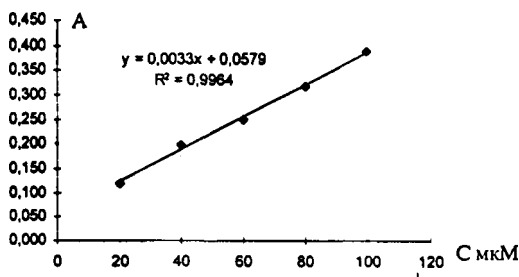
1.3.1. Депротеинизация: к 1 мл плазмы добавить 1 мл 6% раствора цинка сульфата. Оставить на 1 час при температуре ниже 15°C. Центрифугировать при 6000 об/мин (3000 g).

1.3.2. Определение: к 1 мл супернатанта добавить эквивалентное количество гидроксида натрия (300 мкл 1 N раствора), центрифугировать и 1 мл надосадочной жидкости перенести в соответствующую по нумерации пластиковую пробирку с предварительно добавленными туда 0,11 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера, 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Пробирки укупорить и встряхивать в течение 30 минут. Цинковую пыль осадить центрифугированием при 3000 (1500 g) об/мин 10 минут.

1.3.3. Из каждой пластиковой пробирки перенести по 1 мл супернатанта в соответствующую по нумерации стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавить по 1 мл сульфаниловой кислоты и оставить в холодильнике на 10 мин. до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измерить оптическую плотность спустя 30 мин. при длине волны 520 нм.

1.3.4. Расчет: концентрацию нитратов рассчитать по уравнению калибровочного графика с учетом разведения при депротеинизации. Например, уравнение регрессии калибровочного графика $y=0.0033x+0.0579$, где y – оптическая плотность, тогда x (концентрация) = $(y-0.0579)/0.0033$, и следовательно концентрация нитратов/нитритов в пробе с учетом разбавления при депротеинизации – $C = (y-0.0579)/0.0033 \cdot k$, где k – коэффициент разбавления при депротеинизации.

Калибровочный график

Рис 1. Зависимость оптической плотности от концентрации NO_3^-

2. Определение уровня нитратов и нитритов в моче.

2.1. Пробоподготовка. К 1 мл мочи прибавить 0,25 г активированного угля и 3 мл дистиллированной воды, перемешать и угольную пыль осадить центрифугированием (5000 об/мин).

2.2. Определение: 1 мл надосадочной жидкости перенести в соответствующую по нумерации пластиковую пробирку с предварительно добавленными туда 0,11 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера, 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Пробирки закупорить и встряхивать в течение 30 минут. Цинковую пыль осадить центрифугированием при 3000 об/мин. 10 минут. Из каждой пластиковой пробирки перенести по 1 мл супернатанта в соответствующую по нумерации стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавить по 1 мл сульфаниловой кислоты и оставить в холодильнике на 10 мин. до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измерить оптическую плотность спустя 30 мин. при длине волны 520 нм.

2.3. Расчет: концентрацию нитратов рассчитать по уравнению калибровочного графика с учетом разведения при пробоподготовке. Например, уравнение регрессии калибровочного графика $y = ax + b$, где y – оптическая плотность, a и b – коэффициенты уравнения линейной регрессии, тогда x (концентрация) $= (y - b)/a$, и, следовательно, концентрация нитратов/нитритов в пробе с учетом разбавления при пробоподготовке – $C = ((y - b)/a) * k$, где k – коэффициент разбавления при пробоподготовке.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

1. При определении уровня нитратов и нитритов в плазме, необходимо использовать в качестве коагулянта гепарин, поскольку введение хелаторов (цитрат, ЭДТА) в систему значительно снижает воспроизводимость метода.
2. При смене цинковой пыли необходимо построить новый калибровочный график.
3. Следует отметить, что зависимость между концентрацией нитратов и оптической плотностью линейная, а следовательно, и предел обнаружения в значительной степени зависит от чистоты реактивов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Метод не может быть использован при депротеинизации ТХУ, спиртом, ацетонитрилом, вольфрамовой кислотой, поскольку эти реагенты в значительной степени влияют на условия конверсии нитратов в нитриты. Депротеинизацию плазмы следует проводить с использованием 6% раствора цинка сульфата.
2. При концентрации нитратов/нитритов ниже 5.46 мкмоль/л требуются особо чистые реактивы, в противном случае будет нарушаться надежность определения.

Библиотека ВГМУ

